

Uji sensitivitas bakteri yang diisolasi dari ikan dan lingkungan terhadap antimikrob dengan menggunakan metode difusi cakram





© BSN 2016

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar Isi

Prakata	ii
Pendahuluan.....	iii
1 Ruang Lingkup	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip umum.....	1
4 Peralatan	1
5 Bahan	2
6 Prosedur	2
Lampiran A (Informatif) Pembuatan larutan dan media	5
Lampiran B (Informatif) Interpretasi dan rekomendasi baku zona hambat antimikrob bakteri patogen.....	7
Bibliografi	10



Prakata

Standar uji sensitivitas bakteri yang diisolasi dari ikan dan lingkungan terhadap antimikrob dengan menggunakan metode difusi cakram ini menetapkan panduan uji sensitivitas bakteri pada ikan dan lingkungan terhadap antimikrob menggunakan metode difusi cakram untuk memberikan informasi dasar terkait efektivitas antimikrob guna mendukung pengobatan ikan.

Standar ini dirumuskan oleh Komite Teknis 65-07 Perikanan Budidaya dan telah pada konsensus pada tanggal 5 Agustus 2015 di Tangerang Selatan, yang dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-07, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui jajak pendapat pada tanggal 30 September 2015 sampai dengan 29 November 2015 dengan hasil akhir disetujui menjadi RASNI.



Pendahuluan

Peraturan yang dijadikan rujukan di dalam penyusunan standar ini adalah :

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/MEN/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. 02/MEN/2007 tentang Cara Budidaya Ikan yang Baik (CBIB)
4. Keputusan Menteri kelautan dan Perikanan Nomor. 52A/KEPMEN-KP/2013 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor: 26/KEPMEN-KP/2013 tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Media Pembawa, Golongan dan Sebarannya.



Uji sensitivitas bakteri yang diisolasi dari ikan dan lingkungan terhadap antimikrob dengan menggunakan metode difusi cakram

1 Ruang Lingkup

Standar ini menetapkan panduan uji sensitivitas bakteri pada ikan dan lingkungan terhadap antimikrob menggunakan metode difusi cakram untuk memberikan informasi dasar terkait efektivitas antimikrob guna mendukung pengobatan ikan.

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan

2.1

antimikrob

suatu zat, baik alami, semi sintetis maupun sintetis yang dapat menghambat metabolisme/pertumbuhan dan atau membunuh mikroorganisme

2.2

inkubasi

pengkondisian mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai dengan kebutuhan biologisnya

2.3

intermediate

keadaan mikrob yang memiliki respon antara yang resistan dan sensitif terhadap antimikrob

2.4

media agar

media padat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme

2.5

resistan (*resistant*)

keadaan mikrob yang tahan terhadap oleh antimikrob dengan dosis yang digunakan sebagai standar pengobatan

2.6

sensitif (*susceptible*)

keadaan mikrob yang dapat dihambat oleh antimikrob menggunakan dosis standar pengobatan

3 Prinsip umum

Cakram yang mengandung antimikrob akan membentuk zona hambat pada media agar yang diinokulasi bakteri.

4 Peralatan

- a) autoklaf;
- b) bunsen;

- c) cawan petri;
- d) inkubator;
- e) *hot plate*;
- f) jarum Ose;
- g) *laminar air flow*;
- h) *minimixer*;
- i) pinset;
- j) penggaris atau kaliper.

5 Bahan

- a) biakan murni bakteri berumur 18 jam - 24 jam;
- b) cakram antimikrob;
- c) *cotton swab* steril;
- d) larutan fisiologis (0,9 % NaCl);
- e) NaCl;
- f) *Mueller Hinton Agar* (MHA);
- g) *Mueller Hinton Broth* (MHB);
- h) *Trypticase Soy Broth* (TSB);
- i) standar McFarland 0,5

6 Prosedur

6.1 Kondisi pengujian

Selama proses pengujian, dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow*.

6.2 Persiapan biakan bakteri

Siapkan bakteri hasil isolasi dari air dan organ ikan yang sudah diidentifikasi

6.3 Penentuan konsentrasi suspensi sel bakteri

- a) pindahkan biakan bakteri yang telah diidentifikasi (umur 18 jam - 24 jam) ke larutan fisiologis (0,9 % NaCl), MHB atau TSB menggunakan jarum Ose;
- b) inkubasikan biakan bakteri selama 2 jam – 6 jam sampai tingkat kekeruhan suspensi biakan bakteri ekuivalen dengan standar McFarland 0,5;
- c) tempatkan suspensi bakteri dan standar McFarland 0,5 di depan kertas putih bergaris hitam;
- d) homogenkan sampai tingkat kekeruhan kedua larutan relatif sama.

6.4 Inokulasi biakan dan penggunaan cakram antimikrob

- a) siapkan media MHA;
- b) homogenkan suspensi biakan bakteri yang telah sesuai dengan standar McFarland 0,5;
- c) ambil suspensi biakan bakteri menggunakan *cotton swab* steril dan buang kelebihan suspensi bakteri dengan menekan *cotton swab* pada dinding tabung;

- d) oleskan *cotton swab* ke seluruh bagian media MHA sehingga inokulum terdistribusi secara merata kemudian biarkan selama 3 menit - 5 menit agar kondisi media mengering;
- e) tempatkan cakram antimikrob pada media yang diinokulasi biakan bakteri menggunakan pinset steril dengan jarak antar cakram tidak kurang dari 24 mm dan jarak antara cakram dengan tepi cawan petri 10 mm - 15 mm;
- f) posisikan cawan secara terbalik dan inkubasi pada 28 °C – 30 °C selama 16 jam - 24 jam atau pada suhu dan masa inkubasi yang diperlukan bagi setiap spesies bakteri.

CATATAN 1 MHA dapat dimodifikasi dengan penambahan darah domba untuk bakteri yang sulit tumbuh atau ditambahkan NaCl 1,5 % untuk bakteri air laut.

CATATAN 2 Jangan pindahkan cakram setelah menyentuh permukaan media.

6.5 Pengukuran dan interpretasi hasil

- a) lakukan pengukuran diameter zona hambat antimikrob (zona hambat jernih di sekitar cakram antimikrob) menggunakan penggaris atau kaliper dengan pencahayaan yang cukup;
- b) bandingkan hasil pengukuran dengan tabel Kirby Baueur atau modifikasinya (lampiran B1);
- c) jika terdapat dua zona hambat, gunakan data hasil pengukuran zona bagian dalam;
- d) jangan gunakan data jika terdapat zona hambat yang saling tumpang tindih;
- e) jangan gunakan data jika terdapat penyimpangan pada bentuk zona hambat (lonjong, bergerigi);
- f) jangan gunakan data jika hasil pengukuran pada isolat kontrol tidak sesuai dengan batas yang ditetapkan (lampiran B2);
- g) Jika memperoleh hasil seperti pada 6.5.d, 6.5.e dan 6.5.f maka perlu dilakukan pengulangan prosedur pengujian dari awal.

7 Jaminan mutu

Hasil pengujian dinyatakan valid apabila zona hambat pada pengujian bakteri acuan *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) atau *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619) sebagai kontrol sesuai lampiran B.2.

CATATAN Standar disesuaikan dengan bakteri acuan yang memiliki zona hambat sesuai lampiran B.2

8 Keamanan dan keselamatan kerja

- a) cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan pengujian;
- b) gunakan jas lab dan masker selama melakukan pengujian;
- c) lakukan pengujian di dalam *laminar air flow*;
- d) bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan pengujian dengan bahan disinfektan;

- e) bersihkan segera contoh uji yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan disinfektan;
- f) sterilisasi media terlebih dahulu sebelum dicuci.



Lampiran A (Informatif) Pembuatan larutan dan media

A.1 Larutan fisiologis (NaCl 0,9 %)

Bahan :

NaCl	9 g
Akuades	1 000 ml

Cara membuat:

- a) masukkan NaCl ke dalam Erlenmeyer atau wadah tahan panas lainnya;
- b) tambahkan akuades sampai volume 1 000 ml;
- c) sterilisasi menggunakan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit.
- d) dinginkan pada 25 °C sebelum penggunaan atau disimpan di lemari pendingin.

A.2 Media Mueller Hinton Agar

Bahan :

<i>beef infusion</i>	300 g
<i>casamino acids acidase peptone</i>	17,5 g
<i>starch</i>	1,5 g
agar	17 g
akuades	1 000 ml

Cara membuat:

- a) larutkan semua bahan dengan akuades sampai volume 1 000 ml;
- b) tambahkan NaCl 1,5 % untuk spesies bakteri halofilik;
- c) didihkan selama 1 menit;
- d) sterilisasi menggunakan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit;
- e) dinginkan pada 25 °C sebelum penggunaan atau simpan di lemari pendingin.

CATATAN Penambahan MHA dengan darah domba dapat dilakukan ketika suhu media sekitar 45 °C - 46 °C.

A.3 Media MHA (komersial)

Teknik pembuatan media disesuaikan dengan metode dari produsen

A.4. Media agar darah

Bahan:

<i>Tryptone</i>	15 g
<i>Phytone atau soytone</i>	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Akuades	1 000 ml

Cara membuat:

- a) Larutkan semua bahan dengan akuades sampai volume 1 000 ml;
- b) Panaskan dan aduk sampai semua bahan terlarut;

- c) Sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit;
- d) Dinginkan sampai suhu mencapai 45 - 50 °C;
- e) Tambahkan 5 % (v/v) darah domba steril, aduk sampai merata;
- f) Tuang ke dalam cawan petri steril.

A.4. Media agar darah (komersial)

Teknik pembuatan media disesuaikan dengan metode dari produsen

A.5. standar McFarland 0,5

BaCl ₂	0,25 g
H ₂ SO ₄ pekat	1,04 ml

Larutan 100 ml H₂SO₄ 1 %

Masukkan 1,04 ml H₂SO₄ pekat ke dalam labu ukur 100 ml berisi 50 ml akuades. Encerkan sampai 100 ml.

Larutan 25 ml stok BaCl₂ 1 %

Larutkan 0,25 g BaCl₂ dalam 25 ml akuades

Standard McFarland 0,5

- a) tambahkan 0,5 ml larutan BaCl₂ 1 % ke dalam 99,5 ml larutan H₂SO₄ 1 %. Aduk hingga merata dan masukkan dalam botol;
- b) tutup rapat penutup botol dan simpan dalam tempat gelap;
- c) ganti larutan standar apabila terjadi penguapan.

Lampiran B (Informatif)
Interpretasi dan rekomendasi baku zona hambat antimikrob bakteri patogen

Tabel B.1 - Kirby Baueur yang sudah dimodifikasi untuk standar interpretasi zona hambat antimikrob terhadap bakteri patogen pada ikan

Antimikrob	Konsentrasi cakram	Diameter zona hambat (mm)		
		<i>Susceptible</i>	<i>Susceptible</i>	<i>Susceptible</i>
Amikacin	30 µg	>17	15-16	< 14
Amoxicillin-Clavulanic acid				
<i>Staphylococci</i>	20/10 µg	> 20	-	< 19
Organisme lain	20/10 µg	>18	14-17	< 13
Ampicillin*				
<i>Enterobacteriaceae</i>	10 µg	> 17	14-16	< 13
<i>Staphylococci</i>	10 µg	> 29	-	< 28
<i>Enterococci</i>	10 µg	>17	-	< 16
Streptococci (not <i>S. pneumoniae</i>)	10 µg	> 26	19-25	< 18
Cefazolin	30 µg	> 18	15-17	< 14
Ceftiofur	30 µg	> 21	18-20	< 17
Cephalothin	30 µg	> 18	15-17	< 14
Chloramphenicol				
Streptococci (selain <i>S. pneumoniae</i>)	30 µg	> 21	18-20	< 17
Organisme lain	30 µg	> 18	13-17	< 12
<i>S. pneumoniae</i>	30 µg	> 21	-	< 20
Clindamycin	2 µg	> 21	15-20	< 14
Difloxacin	10 µg	> 21	18- 20	< 17
Erythromycin				
Streptococci	15 µg	> 21	16-20	< 15
Organisme lain	15 µg	> 23	14-22	< 13
Enrofloxacin (canine/feline)	5 µg	> 23	-	< 16
Enrofloxacin (chickens/turkeys)	5 µg	> 23	17-22	< 16
Enrofloxacin (bovine)	5 µg	> 21	17-20	< 17
Florfenicol	30 µg	> 19	15- 18	< 14
Gentamicin	10 µg	> 15	13-14	< 12
Imipenem	10 µg	> 16	14-15	< 13
Kanamycin	30 µg	>18	14-17	< 13
Orbifloxacin	10 µg	> 28	-	< 17
Oxacillin				
<i>Staphylococci</i>	1 µg	> 13	11-12	< 10
<i>S. pneumoniae</i>	1 µg	>20	-	-
Penicillin				
<i>Staphylococci</i>	10 units	> 29	-	< 28
<i>Enterococci</i>	10 units	> 15	-	< 14
Streptococci (not <i>S. pneumoniae</i>)	10 units	> 28	20-27	< 19
Penicillin-novobiocin	10 units/30	> 18	15-17	< 14

Antimikrob	Konsentrasi cakram	Diameter zona hambat (mm)		
		<i>Susceptible</i>	<i>Susceptible</i>	<i>Susceptible</i>
	mg			
Pirlimycin	2 µg	> 13	-	< 12
Rifampin				
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5 µg	> 19	17-18	< 16
Organisme lain	5 µg	> 20	17-19	< 16
Tetracycline				
Streptococci	30 µg	> 23	19-22	< 18
Organisme lain	30 µg	> 19	15-18	< 14
Tiamulin	30 µg	> 9	-	< 8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75 µg	> 15	-	< 14
Gram (-) enteric organisms	75 µg	> 20	15-19	< 14
Ticarcillin				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75/10 µg	> 15	-	< 14
Gram(-)enteric organisms	75/10 µg	>20	15-19	< 14
Tilmicosin (Bovine)	15 µg	> 14	11-13	< 10
Tilmicosin (Swine)	15 µg	> 11		< 10
Spectinomycin	100 µg	> 14	11-13	< 10
Sulfisoxazole	250 µg or 300 µg	> 17	13- 16	< 12
Trimethoprim-Sulfamethoxazole^d				
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.25/23.75 µg	> 19	16-18	< 15
Organisme lain	1.25/23.75 µg	> 16	11-15	< 10
Trimethoprim	5 µg			
Vancomycin				
Enterococci 30	30 µg	> 17	15-16	< 14
Streptococci	30 µg	> 17	-	-
Organisme gram positif lain	30 µg	> 12	10-11	< 9

Tabel B.2 - Rekomendasi diameter zona hambat antimikrob terhadap strain kontrol

Antimikrob	Konsentrasi cakram	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (mm)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (mm)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ^a ATCC 49619 (mm)
Amikacin	30 µg	19-26	20-26	18-26	-
Amoxicillin- Clavulanic acid ^b	20/10 µg	18-24	28-36	-	-
Ampicillin	10 µg	16-22	27-35	-	30-36
Cefazolin	30 µg	21-27	29-35	-	-
Cefoxitin	30 µg	23-29	23-2	-	-
Cephalothin	30 µg	15-21	29-37	-	26-32
Chloramphenicol	30 µg	21-27	19-26	-	26-32
Clindamycin	2 µg	-	24-30	-	19-25
Erythromycin	15 µg	-	22-30	-	25-30
Gentamicin	10 µg	19-26	19-27	16-21	-
Imipenem	10 µg	26-32	-	20-28	-
Kanamycin	30 µg	17-25	19-26	-	-
Oxacillin ^c	1 µg	-	18-24	-	<12 ^c
Penicillin	10 units	-	26-37	-	24-30
Rifampin	5 µg	8-10	26-34	-	25-30
Tetracycline	30 µg	18-25	24-30	-	27-31
Ticarcillin	75 µg	24-30	-	21-27	-
Ticarcillin	75/10 µg	24-30	29-37	20-28	-
Clavulanic acid					
Spectinomycin	100 µg	21-25	13-17	10-14	-
Sulfisoxazole	250 µg or 300 µg	15-23	24-34	-	-
Trimethoprim- Sulfamethoxazole ^d	1.25/23.75 µg	23-29	24-32	-	-
Trimethoprim	5 µg	21-28	19-26	-	-
Vancomycin	30 µg		17-21	-	20-27

Keterangan:

- berarti belum ada kisaran yang pasti;
- a hanya untuk aplikasi Mueller-Hinton Agar yang ditambah 5% defibrinasi darah domba dan diinkubasi dalam 5% CO₂;
- b kisaran untuk *E. coli* ATCC 35218 (17-22 mm);
- c paling baik menggunakan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan zona hambatan 18-24 mm;
- d sangat tergantung media yang digunakan terutama untuk jenis *enterococci*.

Sumber: Diadaptasi dari M31-A2 NCCLS. 2002. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-second edition*. NCCLS document M31-A2 (ISBN 1-56238-461-9)

CATATAN Penggunaan antimikrob untuk pengendalian penyakit ikan disesuaikan dengan regulasi yang berlaku

Bibliografi

- [1] American Society for Microbiology. 2005. *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. American Society for Microbiology.USA
- [2] M31-A2 NCCLS. 2002. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-second edition*. NCCLS document M31-A2 (ISBN 1-56238-461-9)
- [3] Ruangpan L dan Eleonor AT. 2004. *Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment*. Southeast Asian Fisheries Development Center Aquaculture Department Tigbauan 5021, Iloilo, Filipina.

